

AN 2001-273385 [28] WPINDEX

DNC C2001-082856

TI Preparation of (R) and/or (S)-2-hydroxy-gamma-butyrolactones from racemic 2-acyloxy-gamma-butyrolactone using hydrolase.

DC B03 D16

IN KALBERMATTEN, G; PETERSEN, M

PA (LONZ) LONZA AG

CYC 94

PI WO 2001018231 A2 20010315 (200128)* GE 41<--

RW: AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SL SZ TZ UG ZW

W: AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW

AU 2000074181 A 20010410 (200137)

ADT WO 2001018231 A2 WO 2000-EP8810 20000908; AU 2000074181 A AU 2000-74181 20000908

FDT AU 2000074181 A Based on WO 2001018231

PRAI US 2000-185366P 20000228; EP 1999-117685 19990908

AN 2001-273385 [28] WPINDEX

AB WO 200118231 A UPAB: 20010522

NOVELTY - (R) and/or (S)-2-hydroxy-gamma-butyrolactones (I) and (II) and/or (R) and/or (S)-2-acyloxy-gamma-butyrolactones (III) and (IV) are prepared by converting a racemic 2-acyloxy-gamma-butyrolactone (V) using hydrolases. (III) and (IV) are obtained as by-products.

DETAILED DESCRIPTION - (R) and/or (S)-2-hydroxy-gamma-butyrolactones of formulas (I) and (II) and/or (R) and/or (S)-2-acyloxy-gamma-butyrolactones of formulas (III) and (IV) are prepared by converting a racemic 2-acyloxy-gamma-butyrolactone of formula (V) using hydrolases. (III) and (IV) are obtained as by-products.

R1 = alkyl, cycloalkyl, (cycloalkyl)alkyl, cycloheteroalkyl, (cycloheteroalkyl)alkyl, alkoxyalkyl, aryl, heteroaryl, arylalkyl, heteroarylalkyl or aryloxyalkyl.

INDEPENDENT CLAIMS are also included for:

(1) the preparation of (V) by reacting a 2-halo-gamma-butyrolactone of formula (VI) with a carboxylic acid of formula R1a-COOH (VII); and
(2) new 2-acyloxy-gamma-butyrolactone of formula (VIII).

X = halo; and

R1a = alkyl, alkoxyalkyl, arylalkyl or aryloxyalkyl.

USE - The process is useful for preparing (R) and/or (S)-2-hydroxy-gamma-butyrolactones (I) and (II) and/or (R) and/or (S)-2-acyloxy-gamma-butyrolactones (III) and (IV) from racemic 2-acyloxy-gamma-butyrolactone (V).

**(12) NACH DEM VERTRÄG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

**(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro**



A standard linear barcode is located at the bottom of the page, spanning most of the width. It is used for tracking and identification of the journal issue.

**(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. März 2001 (15.03.2001)**

PCI

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/18231 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12P 41/00

[DE/CH]; Sandstrasse 7, CH-3930 Visp (CH). KALBER

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08810

MITTEN

(74) Anwälte: RITTALER, Wolfgang usw.; Winter Brandl Fürniss Hübner Röss Kaiser Polte Partnerschaft, Alois-Steinecker-Str. 22, 85354 Freising (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. September 2000 (08.09.2000)

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von

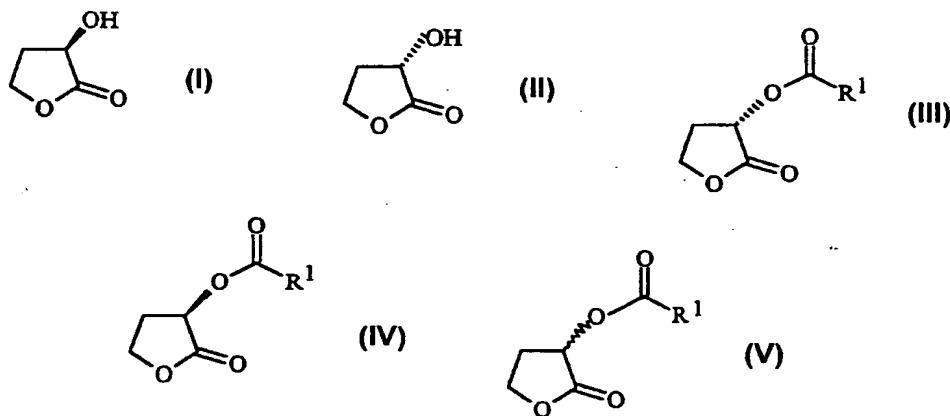
(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PETERSEN, Michael

[Fortschreibung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING (R) OR (S)-HYDROXY- γ -BUTYROLACTONE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON (R)-ODER (S)-HYDROXY- γ -BUTYROLACTON



(57) **Abstract:** The invention relates to a novel method for producing (R) and/or (S)-2-hydroxy- γ -butyrolactones of formulas (I) and (II) and/or for producing (S) and/or (R)-2-acyloxy- γ -butyrolactones of the general formulas (III) and (IV). According to said method, a racemic 2-acyloxy- γ -butyrolactone of general formula (V) is converted into the compounds of formulas (I) or (II) using hydrolases, whereby the compounds of formulas (III) or (IV) are obtained as a by-product.

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben wird ein neues Verfahren zur Herstellung von (R)- und/oder (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolactonen der Formeln (I) und (II) und/oder von (S)- und/oder (R)-2-Acyloxy- γ -butyrolactonen der allgemeinen Formeln (III) und (IV), worin ein racemisches 2-Acyloxy- γ -butyrolacton der allgemeinen Formel (V) mittels Hydrolasen in die Verbindungen der Formeln (I) oder (II) umgesetzt wird, wobei die Verbindungen der Formeln (III) oder (IV) anfallen.

WO 01/18231 A2



(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

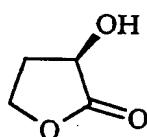
- *Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

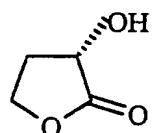
Verfahren zur Herstellung von (R)- oder (S)-Hydroxy- γ -butyrolacton

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von

5 (R)- und/oder (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton der allgemeinen Formeln I und II

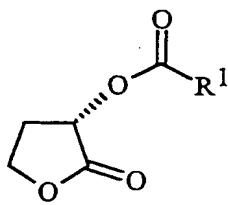


I

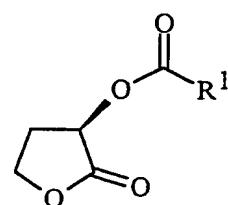


II

10 und/oder von (S)- und/oder (R)-2-Acyloxy- γ -butyrolactonen der allgemeinen Formeln III und IV



III



IV

15

(R)- und (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolactone sind wichtige Zwischenprodukte für pharmazeutische Wirkstoffe (WO 97/24367).

Ein Verfahren zur Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton ist in der EP-A-439 779
 20 beschrieben. Dabei wird in einer ersten Stufe racemisches Hydroxy- γ -butyrolacton in Gegenwart eines Esters wie Vinylacetat mittels einer Lipase in das (R)-Acetoxy- γ -butyrolacton überführt, wobei das (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton anfällt. In der zweiten Stufe wird dann das (R)-Acetoxy- γ -butyrolacton chemisch zum gewünschten Produkt hydrolysiert. Nachteilig bei diesem Verfahren sind zum einen die sehr langen Reaktionszeiten in der ersten Stufe und zum
 25 anderen, dass es in zwei Stufen durchgeführt werden muss, wenn (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton als Produkt hergestellt werden soll.

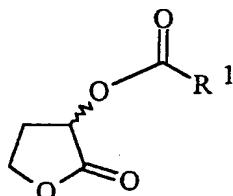
Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung von (R)- und/oder (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolactonen bereit zu stellen, welches wesentlich kürzere Reaktionszeiten aufweist und die Isolierung der entsprechenden Produkte in guter Enantiomerenreinheit erlaubt.

5

Diese Aufgabe wird mit dem Verfahren nach Anspruch 1 gelöst.

Erfindungsgemäss wird das Verfahren derart durchgeführt, dass man ein racemisches 2-Acyloxy- γ -butyrolacton der allgemeinen Formel

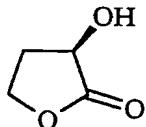
10



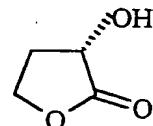
V

mittels Hydrolasen in die (R)- und/oder (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolactone der Formeln I oder II

15



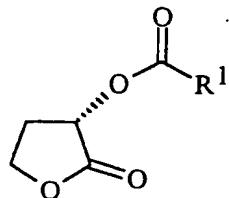
I



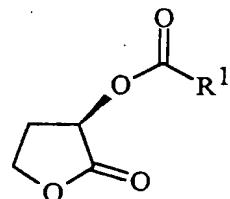
II

Umsetzt, wobei die (S)- und/oder (R)-2-Acyloxy- γ -butyrolactone der allgemeinen Formeln III oder IV

20



III



IV

anfallen.

Der Rest R¹ bedeutet gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Cycloalkyl, (Cycloalkyl)alkyl, Heterocycloalkyl, (Heterocycloalkyl)alkyl, Alkoxyalkyl, Aryl, Heteroaryl, Arylalkyl, Heteroarylalkyl oder Aryloxyalkyl.

5

Unter Alkyl, allein oder in Verbindung mit Aryl, Alkoxy, Aryloxy, etc., wird sowohl lineares als auch verzweigtes Alkyl verstanden. Insbesondere bedeutet Alkyl C₁₋₁₈-Alkyl, vorzugsweise C₅₋₁₈-Alkyl. Beispiele für lineares oder verzweigtes Alkyl sind Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, tert-Butyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl, Octyl, Nonyl, Decyl, Dodecyl, Tridecyl,

10 Tetradearyl, Pentadecyl, Hexadecyl, Heptadecyl, Octadecyl und deren Isomere. Bevorzugt wird lineares Alkyl. Alkyl kann gegebenenfalls ein oder mehrere Substituenten tragen, beispielsweise Halogen, Hydroxy, Amino und Nitro. Halogen bedeutet hierbei F, Cl, Br und I.

Unter Aryl wird insbesondere Phenyl, Naphthyl und Anthryl verstanden. Aryl kann 15 gegebenenfalls ein oder mehrere Substituenten tragen, beispielsweise Halogen, Hydroxy, Amino, Nitro, Alkyl, insbesondere C₁₋₁₂-Alkyl, vorzugsweise C₁₋₆-Alkyl, und Alkoxy, insbesondere C₁₋₁₂-Alkoxy, vorzugsweise C₁₋₆-Alkoxy. Beispiele für substituiertes Aryl sind Chlorphenyl, Nitrophenyl, Methoxyphenyl, Toluyl und Xylyl.

20 Unter Heteroaryl werden insbesondere 5- oder 6-gliedrige aromatische Ringsysteme mit ein oder mehreren Heteroatomen wie O oder N verstanden. Beispiele für Heteroaryl sind Furanyl, Pyridyl und Pyrimidyl. Heteroaryl kann gegebenenfalls wie für Aryl beschrieben substituiert sein.

25 Arylalkyl bedeutet insbesondere Aryl-C₁₋₁₂-Alkyl, vorzugsweise Aryl-C₁₋₆-Alkyl, beispielsweise Benzyl oder Phenylethyl, und kann gegebenenfalls wie oben für Alkyl und Aryl beschrieben substituiert sein.

Unter Cycloalkyl und Heterocycloalkyl werden cyclische nichtaromatische Kohlenwasserstoffe 30 mit insbesondere bis zu 8 Ringatomen, vorzugsweise 5 bis 8 Ringatomen, verstanden, die im Falle von Heterocycloalkyl ein oder mehrere Heteroatome wie N oder O enthalten können. Beispiele für Cycloalkylreste sind Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl und

Cyclooctyl. Beispiele für bevorzugte Heterocycloalkylreste sind Piperidyl, Pyrrolidyl und Tetrahydrofuranyl. Cycloalkyl und Heterocycloalkyl können gegebenenfalls wie oben für Aryl beschrieben substituiert sein. (Cycloalkyl)alkyl und (Heterocycloalkyl)alkyl bedeuten vorzugsweise (Cycloalkyl)-C₁₋₆-alkyl bzw (Heterocycloalkyl)-C₁₋₆-alkyl.

5

Alkoxyalkyl bedeutet insbesondere C₁₋₁₈-Alkoxy-C₁₋₁₈-alkyl, zweckmäßig mit nicht mehr als 18 Kohlenstoffatomen. Vorzugsweise bedeutet Alkoxyalkyl C₁₋₆-Alkoxy-C₁₋₆-alkyl. Beispiele für Alkoxyalkyl sind Methoxymethyl, Ethoxymethyl, Methoxyethyl, Ethoxyethyl und Propoxyethyl. Alkoxyalkyl kann wie für Alkyl beschrieben substituiert sein.

10

(Hetero)aryloxyalkyl bedeutet insbesondere (Hetero)aryloxy-C₁₋₁₂-Alkyl, vorzugsweise (Hetero)aryloxy-C₁₋₆-Alkyl. Beispiele für (Hetero)aryloxyalkyl sind Phenoxyethyl, Phenoxyethyl und Furanylmethyl. (Hetero)aryloxyalkyl kann gegebenenfalls wie oben für Arylalkyl beschrieben substituiert sein.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist der Rest R¹ einschließlich eventueller Ring- und Heteroatome eine Kettenlänge von wenigstens 5 Atomen, insbesondere 5 C-Atomen, und von höchstens 18 Atomen, insbesondere C-Atomen, auf.

- 20 Unter racemischen Verbindungen im Sinne der vorliegenden Erfindung werden Mischungen verstanden, in denen beide Enantiomeren vorliegen, wobei das eine oder andere Enantiomer auch im Überschuß vorliegen kann. Vorzugsweise liegen die beiden Isomeren in gleichen Anteilen vor. Entsprechend wird der Begriff Racemat gebraucht. Liegt eines der Enantiomeren im Überschuß vor, so ist das im Gemisch überwiegende Enantiomere des Acyloxy-Derivates
25 vorzugsweise dasjenige, das von der Hydrolase bevorzugt zum entsprechenden Hydroxy-Lacton umgesetzt wird. Im Kontext der vorliegenden Erfindung bezeichnet der Begriff Enantiomere die beiden Konfigurationsisomere am chiralen C-2 des 2-Hydroxy- γ -butyrolactons und der entsprechenden Acyloxy-Derivate. Allfällige weitere Chiralitätszentren in den erfindungsgemäßen Resten R₁, R₂ dieser Derivate werden bei dieser Definition,
30 abweichend vom wissenschaftlichen Gebrauch, nicht berücksichtigt.

- Als Hydrolasen können Lipasen, Esterasen, Amidasen oder Proteasen verwendet werden, vorzugsweise werden Lipasen eingesetzt. Geeignete Lipasen sind Lipasen aus *Pseudomonas* sp., insbesondere Lipase aus *Pseudomonas fluorescens*, z.B. Lipase AK (Amano) oder die von Biocatalyst Ltd. erhältliche Lipase, Lipase aus *Pseudomonas cepacia*,
- 5 z.B. Lipase PS (Amano), Lipase aus *Aspergillus oryzae*, z.B. Novo-Lipase SP523 (Novozym 398) und Novo-Lipase SP524 (Lipase = Palatase 20000L von Novo), Lipase aus *Candida antarctica*, z.B. Novo-Lipase SP525 (Lipase B Novozym 435, immobilisiert) und Novo-Lipase SP526 (Lipase A Novozym 735, immobilisiert), Lipase aus *Rhizopus niveus*, z.B. Newlase I, Lipase aus *Candida rugosa*, z.B. Lipase AY, Lipase aus *Candida cylindracea*, Lipase aus
- 10 *Candida lipolytica*, Lipase aus *Mucor miehei*, Lipase aus *Aspergillus niger*, und Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus*. Weitere für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Lipasen sind z.B. handelsübliche Lipasen wie Lipase PPL (Lipase-Kits von Fluka (1 & 2)), Amano P Lipase, Lipase AH (Amano; immobilisiert), Lipase P (Nagase), Lipase G (Amano 50), Lipase F (Amano F-AP15), immobilisierte Lipase PS wie Lipase PS-C I und Lipase PS-C II (Amano),
- 15 Lipase AH wie Lipase AH-C I (Amano), und Lipase D (Amano). Bevorzugt werden Lipasen aus *Pseudomonas* sp., insbesondere aus *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas cepacia*, eingesetzt, sowohl wegen ihrer vorteilhaften katalytischen Eigenschaften als auch wegen ihrer Stabilität.
- 20 Die Lipasen können als Proteinlyophilisat oder als Immobilisat eingesetzt werden. Die Lipasen, sowohl als freies Protein wie auch als Immobilisat, können nach erfolgter erfindungsgemässer Umsetzung zurückgewonnen und wiederverwendet werden. Das Protein lässt sich beispielsweise durch Filtration oder, insbesondere als Immobilisat auf einer dichten Festphase, durch Zentrifugation und gegebenenfalls zusätzliche Wasch- und Suspensionsschritte,
- 25 wiedergewinnen. Insbesondere bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, die nicht-wässrige Lösungsmittel wie beispielsweise Butanol oder Ether oder auch Lösungsmittelgemische verwenden, in denen das Protein unlöslich ist, erlauben eine einfache Rückgewinnung des freien Proteins, beispielsweise durch Filtration. Vorzugsweise wird ein rückgewonnener Lipasebatch mindestens 10-15x im erfindungsgemässen Verfahren eingesetzt.
- 30 Lipasen sind Enzyme, die bevorzugt, entsprechend der amphiphilen Natur ihrer biologischen Triglyceridsubstrate, an Grenzflächen zwischen einer hydrophilen und einer hydrophoben

Phase arbeiten. Insbesondere bei Verwendung eines racemischen 2-Acyloxy- γ -butyrolactons mit einem grossen Acylrest mit mindestens 5 C-Atomen als Lipasesubstrat ergibt sich ein feindisperses Zwei-Phasen-System mit einem sehr geringen Verteilungskoeffizienten des Substrates in der polaren bzw. wässrigen Phase. Die Lipase kann dann stabil an der

- 5 Phasengrenzfläche lokalisiert die Umsetzung katalysieren.

Beispiele für Proteasen sind Proteasen aus *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Streptomyces* oder *Bacillus* sp., beispielsweise handelsübliche Proteasen wie Serinproteasen, z.B. Subtilisine. Als Subtilisin kann z.B. Savinase aus *Bacillus* sp. (beispielsweise Savinase von Novo Nordisk),

- 10 Alcalase oder Subtilisin aus *Bacillus licheniformis* verwendet werden.

Als Esterasen können ebenfalls handelsübliche Esterasen, wie z.B. Esterasen aus *Bacillus* sp., eingesetzt werden.

- 15 Beispiele für Amidasen sind ebenfalls handelsübliche Amidasen, wie z.B. Penicillinamidase (Fluka).

Die Lipasen, Esterasen, Amidasen oder Proteasen des erfindungsgemässen Verfahrens können, wie dem Fachmann bekannt, als zellfreie Enzymextrakte, gereinigtes und/oder lyophilisiertes

- 20 Protein oder auch exprimiert in einer Mikroorganismenzelle, insbesondere im Herkunftsorganismus, angewendet werden. Es kann sich auch um aus Wildtypenzymen durch Protein Engineering, beispielsweise „gene shuffling“ oder Punktmutagenese, gewonnene Varianten mit für die Verfahrensdurchführung vorteilhaften Eigenschaften handeln. Es kann sich auch um durch vernetzende Reagenzien stabilisierte Enzyme bzw. auf der Oberfläche 25 geeigneter Materialien immobilisierte Enzyme handeln. Die Einflüsse von pH, Ionenstärke und Lösungsmittel auf die Enzymaktivität sind dem Fachmann geläufig.

Wenn als Hydrolasen Lipasen eingesetzt werden, wird vorzugsweise im racemischen 2-Acyloxy- γ -butyrolacton überwiegend das (R)-Enantiomere zum (R)-2-Hydroxy- γ -

- 30 butyrolacton umgesetzt, wobei das (S)-2-Acyloxy- γ -butyrolacton der Formel III anfällt. Wenn als Hydrolasen Proteasen eingesetzt werden, vorzugsweise Savinase aus *Bacillus* sp. (Fa. Novo

Nordisk), wird vorzugsweise im racemischen 2-Acyl- γ -butyrolacton vorwiegend das (S)-Enantiomere zum (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton umgesetzt, wobei das (R)-2-Acyloxybutyrolacton der Formel IV anfällt. Dem Fachmann ist dabei geläufig, dass es auch Lipasen geben kann, die in Kombination mit einem geeigneten Substrat vorwiegend das (S)-2-Hydroxy-
5 γ -butyrolacton bilden.

Die Reaktionstemperatur kann in einem Bereich von 0 bis 100°C, vorzugsweise in einem Bereich von 20 bis 70°C liegen und am meisten bevorzugt in einem Bereich von 15-30°C liegen. Der pH-Wert kann in einem Bereich von 3 bis 12, vorzugsweise von 4 bis 8 liegen.

10

Das Verfahren wird bevorzugt mit hoher Substratkonzentration, das heisst unter Substratsättigung des Enzyms, durchgeführt. Vorzugsweise ist die Substratkonzentration des racemischen 2-Acyloxy-butyrolactons mindestens 10 mM, in einer bevorzugteren Ausführungsform mindestens 30 mM.

15

Bevorzugt wird die Umsetzung in einer wässrigen Pufferlösung oder in einem Alkohol oder in einem bezüglich der Umsetzung inerten organischen Lösungsmittel durchgeführt. Als Pufferlösungen können z. B. niedermolare Puffer, beispielsweise 5 bis 200 mM Natrium- oder Kaliumphosphatpuffer oder Hepes-Puffer, verwendet werden. Als Alkohole können bevorzugt 20 aliphatische, cycloaliphatische oder aromatische Alkohole verwendet werden. Als aliphatische Alkohole können z.B. C₁₋₈-Alkohole wie Methanol, Ethanol, 1- oder 2- Propanol, Isopropanol, Butanol, insbesondere 1- oder 2-Butanol, Pentanol, Hexanol, Heptanol oder Octanol verwendet werden. Als cycloaliphatische Alkohole können z.B. Alkohole wie Cyclohexanol verwendet werden. Als aromatischer Alkohol kann z.B. Benzylalkohol eingesetzt werden. Als 25 organisches Lösungsmittel kann beispielsweise Diethylether or Methyl-tertiär-butylether dienen. Es ist auch möglich, Gemische dieser Lösungsmittel zu verwenden, beispielsweise Alkohol in Ether.

Bei Verwendung von Alkohol anstelle eines wässrigen Puffers wird die spontane chemische, 30 sterisch unselektive Hydrolyse als Konkurrenzreaktion zur enzymkatalysierten Umsetzung vermieden.

Es ist auch möglich, Gemische von Wasser und einem organischen Lösungsmittel oder einem Alkohol in beliebigen Mischungsverhältnissen für die erfindungsgemäße Umsetzung zu benutzen; in diesem Falle können sich für die Enzymaktivität oder -selektivität vorteilhafte Lösungsmitteleffekte ergeben.

5

Dem Fachmann ist an sich bekannt, dass bei Verwendung eines nicht-wässrigen Lösungsmittels und besonders eines polaren Lösungsmittels wie einem Alkohol, ein geringer Wassergehalt von 0,01%-10% (w/w), besonders bevorzugt von 1-4% (w/w), zur Stabilisierung des Enzyms bzw. der Aufrechterhaltung einer Hydrathülle um das Protein vorteilhaft sein kann. Dieser geringe Wasseranteil sollte für jede im wesentlichen wasserfreie Ausführungsform umfassend ein 10 2-Acyloxy- γ -butyrolacton, einen Alkohol und ein Enzym durch einfache Versuche optimiert werden. Er kann variieren.

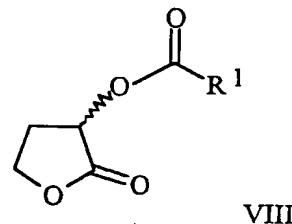
15 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird aus racemischem 2-Acyloxy- γ -butyrolacton mit einer Pseudomonas-Lipase, beispielsweise Lipase PS, mit dem vorgenannten C₁₋₈-Alkohol mit einem geringem Wassergehalt von 0,5-5% durch Umesterung das entsprechende (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton freigesetzt. Der Alkohol kann beispielsweise 20 1-oder 2-Butanol oder Propanol oder Ethanol sein. Die Temperatur ist vorzugsweise Raumtemperatur, also 15-30°C. Das (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton kann in dieser Ausführungsform eine Enantiomerenreinheit bzw. einen Enantiomerenüberschuss von mindestens 80%, vorzugsweise mindestens 95% aufweisen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Acylrest des Acyloxy- γ -Butyrolactons dabei ein linearer Pentanoyl-, Hexanoyl-, Heptanoyl-, Octanoyl- oder Dodecanoylrest.

25 Nach einer üblichen Umsetzungszeit von 1 bis 100 Stunden können dann die gewünschten Verbindungen der Formeln I oder II und die der allgemeinen Formeln III oder IV durch übliche Aufarbeitungsmethoden erhalten werden.

30 Bevorzugte Verbindungen sind (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton, (S)-2-Acetoxy- γ -butyrolacton, (S)-2-Phenoxyacetoxy- γ -butyrolacton, (S)-2-Phenylacetoxy- γ -butyrolacton, (S)-2-(2-Methoxyacetoxy)- γ -butyrolacton, (S)-2-Isobutyryloxy- γ -butyrolacton, (S)-2-Hydroxy- γ -

- butyrolacton, (R)-2-Acetoxy- γ -butyrolacton, (R)-2-Phenoxyacetoxy- γ -butyrolacton,
 (R)-2-Phenylacetoxy- γ -butyrolacton, (R)-2-(2-Methoxyacetoxy)- γ -butyrolacton,
 (R)-2-Isobutyryloxy- γ -butyrolacton, (S)-2-Propionyloxy- γ -butyrolacton, (S)-2-Butyryloxy- γ -
 butyrolacton, (S)-2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton, (S)-2-Hexanoyloxy- γ -butyrolacton,
 5 (S)-2-Decanoyloxy- γ -butyrolacton, (S)-2-Dodecanoyloxy- γ -butyrolacton, (R)-2-Octanoyloxy- γ -
 butyrolacton, (R)-2-Hexanoyloxy- γ -butyrolacton, (R)-2-Decanoyloxy- γ -butyrolacton und
 (R)-2-Dodecanoyloxy- γ -butyrolacton bzw., als Substrate der erfundungsgemässen Umsetzung,
 die racemischen Gemische der genannten 2-Acyloxy- γ -butyrolactone.

10 2-Acyloxy- γ -butyrolactone der allgemeinen Formel VIII



- worin R¹ wie oben definiert gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Cycloalkyl, (Cycloalkyl)alkyl,
 15 Heterocycloalkyl, (Heterocycloalkyl)alkyl, Alkoxyalkyl, Aryl, Heteroaryl, Arylalkyl,
 Heteroarylalkyl oder Aryloxyalkyl bedeutet, sind in der Literatur noch nicht beschrieben und
 sind demzufolge Bestandteil der Erfindung. Dies gilt sowohl für die Racemate dieser
 Verbindungen wie für die jeweiligen (R)- und (S)-Enantiomeren. Bevorzugte Beispiele für
 entsprechende 2-Acyloxy- γ -butyrolactone sind (R)- und (S)-2-Isobutyryloxy-, (R)- und (S)-2-
 20 (2-Methoxyacetoxy)-, (R)- und (S)-Chloracetoxy-, (R)- und (S)-Phenylacetoxy-, (R)- und (S)-
 Phenoxyacetoxy- γ -butyrolacton sowie deren Racemate. Weitere bevorzugte Beispiele sind (R)-
 und (S)-2-Pentanoyloxy- γ -butyrolacton, (R)- und (S)-2-Hexanoyloxy- γ -butyrolacton, (R)- und
 (S)-2-Heptanoyloxy- γ -butyrolacton, (R)- und (S)-2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton, (R)- und (S)-
 25 2-Nonanoyloxy- γ -butyrolacton, (R)- und (S)-2-Decanoyloxy- γ -butyrolacton, (R)- und (S)-2-
 Dodecanoyloxy- γ -butyrolacton, (R)- und (S)-2-Tetradecanoyloxy- γ -butyrolacton, (R)- und
 (S)-2-Hexadecanoyloxy- γ -butyrolacton, (R)- und (S)-2-Octadecanoyloxy- γ -butyrolacton sowie
 deren Racemate.

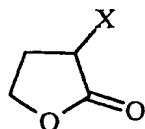
In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um einen C₅₋₁₈-Alkylrest, in einer noch bevorzugteren Ausführungsform ist dieser Alkylrest unverzweigt.

Es ist dem Fachmann geläufig, dass bei derartigen Racematspaltungen durch Lipasen, 5 Amidasen, Esterasen und Proteasen eine kinetische Kontrolle der Umsetzung vorliegt. Die Spaltungsreaktion würde thermodynamisch kontrolliert bis zum fast vollständigen Umsatz des Substrates ablaufen. Soll vornehmlich ein möglichst grosser Überschuss eines Enantiomers des 2-Hydroxy- γ -butyrolactons erzeugt werden, so wird die Reaktion bevorzugt nur bis zu einem Umsatz von höchstens 40-50% durchgeführt. Soll vornehmlich ein möglichst 10 enantiomerenreines 2-Acyloxy- γ -butyrolacton, also der (R)- oder (S)-Ester, durch die Umsetzung aus dem Racemat gewonnen werden, so wird der Umsatz bevorzugt mindestens 50%, bei weniger ausgeprägter Stereoselektivität der Hydrolase kann der Umsatz auch mehr als 70% des eingesetzten Racemates betragen. Dem Fachmann ist der reziproke 15 Zusammenhang zwischen der Enantiomerenreinheit des 2-Hydroxy- γ -butyrolactons und dem gesamten Umsatz bzw. der Enantiomerenreinheit des verbleibenden 2-Acyloxy- γ -butyrolactons an sich bekannt.

Die Verwendung langkettiger Reste R¹ (mindestens C₅) ist eine weitere, besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung, weil bei der Aufreinigung des Reaktionsgemisches eine 20 möglichst weitgehende und schonende Abtrennung des nicht umgesetzten 2-Acyloxy- γ -butyrolactons vom Produkt, dem 2-Hydroxy- γ -butyrolacton, vorgenommen werden kann. Langkettige 2-Acyloxy- γ -butyrolactone haben einen erheblich höheren Schmelzpunkt als das Produkt und können durch Kristallisation bei tiefer Temperatur abgetrennt werden.

25 Es ist dem Fachmann klar, dass jede Ausführungsform der Erfindung, durch die als unmittelbares Produkt des Verfahrens vorwiegend (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton erzeugt wird, auch zur Herstellung des (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolactons dienen kann. Dies, indem das als im Zuge der Umsetzung in hohem Enantiomerenüberschuss vorliegende Edukt (S)- 2-Hydroxy- γ -butyrolacton nach Aufreinigung des Reaktionsgemisches durch chemische oder 30 enzymatische Hydrolyse, beispielsweise wieder durch enzymatische Hydrolyse gemäss dem vorliegendem Verfahren, in das (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton überführt wird.

Die Ausgangsmaterialien für die biotechnologische Hydrolyse, die racemischen 2-Acyloxy- γ -butyrolactone, werden zweckmäßig dadurch hergestellt, dass ein 2-Halogen- γ -Butyrolacton der allgemeinen Formel VI



5

VI

worin X ein Halogenatom bedeutet, mit einer Carbonsäure der allgemeinen Formel



10

worin R^1 die oben genannte Bedeutung hat, umgesetzt wird. Als Halogenatom kann F, Cl, Br oder J eingesetzt werden. Als Carbonsäuren der allgemeinen Formel VII können die den zuvor beschriebenen Resten R^1 entsprechenden Carbonsäuren verwendet werden. Derartige Umsetzung von Alkylhalogeniden zur Darstellung von Carbonsäureestern sind dem Fachmann wohlbekannt. Zweckmäßig wird als Carbonsäure der allgemeinen Formel VII beispielsweise Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Isobuttersäure, Capronsäure, Octansäure, Decansäure, Dodecansäure, Tetradecansäure, Hexadecansäure, Octadecansäure, Chloressigsäure, Phenylessigsäure, Phenoxyessigsäure, Methoxyessigsäure, Benzoësäure usw., entsprechend den erfundungsgemäßen 2-Acyloxy-Derivaten, verwendet. Zweckmäßig kann dabei die 15 Carbonsäure als Lösungsmittel dienen.

15

Zweckmäßig wird die Umsetzung in Gegenwart einer Base durchgeführt. Als Basen können Triethylamin, Pyridine, Hünig-Basen oder Alkalimetallhydroxide eingesetzt werden. Als 20 Alkalimetallhydroxid kann Natrium- oder Kaliumhydroxid verwendet werden.

25

Die Umsetzung wird zweckmäßig bei einer Temperatur von 30 bis 150°C, vorzugsweise bei einer Temperatur von 60 bis 120 °C durchgeführt.

Nach einer üblichen Umsetzungszeit von 2 bis 14 Stunden werden die racemischen 2-Acyloxy- γ -butyrolacton-Derivate der allgemeinen Formel V durch übliche Aufarbeitungsmethoden erhalten.

5 **Beispiele:**

Beispiel 1

Herstellung von (RS)-2-Acetoxy- γ -butyrolacton

Eine Lösung von 165 g 2-Brom- γ -butyrolacton (97% Gehalt) in 180 g Eisessig wurde auf 10 80°C erwärmt. Innert 2 h wurden bei 80°C Innentemperatur 120 g Triethylamin zugetropft. Die entstandene Suspension wurde weitere 7 h bei 80°C gerührt. Der Essigsäure-Überschuss wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 500 ml Ethylacetat aufgeschlämmt und unlösliche Anteile durch Filtration abgetrennt (Filterkuchen zweimal mit je 125ml Ethylacetat waschen). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 750 ml 1M Natronlauge extrahiert, 15 mit 250 ml 0,5 M Schwefelsäure gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Das verbleibende Öl (105 g) wurde im Vakuum destilliert (73°C / 0,1 mbar).

Man erhielt 92 g (RS)-2-Acetoxy- γ -butyrolacton als schwach gelbliche Flüssigkeit (Gehalt lt. GC > 96%).

¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): γ = 5,41 (dd, 2-H), 4,47 (ddd, 4-H), 4.35 (ddd, 4-H'), 2,73 (dddd, 3-H), 2.33 (dddd, 3-H'), 2,17 (s, 3 H, Ac).

Beispiel 2

Herstellung von (RS)-2-(Propionyloxy)- γ -butyrolacton

Eine Lösung von 178 g 2-Brom- γ -butyrolacton (90% Gehalt) in 222 g 2-Propionsäure wurde auf 25 80°C erwärmt. Innert 2 h wurden bei 80°C Innentemperatur 120 g Triethylamin zugetropft. Die entstandene Suspension wurde weitere 6 h bei 80 °C gerührt. Es wurde weiter wie in Beispiel 1 verfahren. Das verbleibende braune Öl (159g) wurde im Vakuum destilliert (82°C / 0,07 mbar). Man erhielt 139 g (RS)-2-(Propionyloxy)- γ -butyrolacton als schwach gefärbte Flüssigkeit (Gehalt lt. GC > 98%).

¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ = 5.42 (dd, 2-H), 4.48 (ddd, 4-H), 4.33 (ddd, 4-H'), 2.73 (m, 3-H), 2.43 (m, 2 H, CH₂), 2.30 (m, 3-H'), 1.18 (dd, 3 H, CH₃).

Beispiel 3**3.1 Herstellung von (RS)-2-(Butyryloxy)- γ -butyrolacton**

Eine Lösung von 167 g 2-Brom- γ -butyrolacton (90% Gehalt) in 248 g Buttersäure wurde auf

5 80°C erwärmt. Innert 2 h wurden bei 80°C Innentemperatur 114 g Triethylamin zugetropft.

Die entstandene Suspension wurde weitere 6 h bei 80 °C gerührt. Es wurde weiter wie in Beispiel 1 verfahren. Das verbleibende braune Öl (166g) wurde im Vakuum destilliert (85°C / 0,07 mbar). Man erhielt 138 g (RS)-2-(Butyryloxy)- γ -butyrolacton als schwach gelbliche Flüssigkeit (Gehalt lt. GC \geq 99%).

10 1 H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ = 5.42 (dd, 2-H), 4.48 (ddd, 4-H), 4.33 (ddd, 4-H'), 2.73 (dddd, 3-H), 2.40 (m, 2 H, CH₂), 2.30 (dddd, 3-H'), 1.68 (ddt, 2 H, CH₂), 0.95 (t, 3 H, CH₃).

3.2 Herstellung von (RS)-2-(Pentanoyloxy)- γ -butyrolacton

15 Analog zu Beispiel 3.1 wurde 2-Brom- γ -butyrolacton mit Pentansäure und Triethylamin umgesetzt zu (RS)-2-(Pentanoyloxy)- γ -butyrolacton.

1 H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ = 5.42 (dd, 2-H), 4.46 (ddd, 4-H), 4.32 (ddd, 4-H'), 2.72 (m, 3-H), 2.41 (m, 2 H), 2.31 (dddd, 3-H'), 1.64 (m, 2 H), 1.39 (m, 2 H), 0.92 (t, 3 H).

20 3.3 Herstellung von (RS)-2-(Hexanoyloxy)- γ -butyrolacton

Analog zu Beispiel 3.1 wurde 2-Brom- γ -butyrolacton mit Hexansäure und Triethylamin umgesetzt zu (RS)-2-(Hexanoyloxy)- γ -butyrolacton.

1 H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ = 5.42 (dd, 2-H), 4.46 (ddd, 4-H), 4.32 (ddd, 4-H'), 2.70 (m, 3-H), 2.40 (m, 2 H), 2.30 (dddd, 3-H'), 1.64 (m, 2 H), 1.35 (m, 4 H), 0.90 (m, 3 H).

25

3.4 Herstellung von (RS)-2-(2-Phenylacetoxy)- γ -butyrolacton

Analog zu Beispiel 3.1 wurde 2-Brom- γ -butyrolacton mit 2-Phenylacetoxy und Triethylamin umgesetzt zu (RS)-2-(2-Phenylacetoxy)- γ -butyrolacton.

1 H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ = 7.31 (m, 5 H_{ar}), 5.42 (dd, 2-H), 4.42 (ddd, 4-H), 4.24 (ddd, 4-H'), 3.78 (d, H_{bn}), 3.72 (d, H_{bn}), 2.63 (m, 3-H), 2.22 (dddd, 3-H').

3.5 Herstellung von (RS)-2-(2-(2-Methoxyethoxy)-acetoxy)- γ -butyrolacton

Analog zu Beispiel 3.1 wurde 2-Brom- γ -butyrolacton mit 2-(2-Methoxyethoxy)-essigsäure und Triethylamin umgesetzt zu (RS)-2-(2-(2-Methoxyethoxy)-acetoxy)- γ -butyrolacton.

1 H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ = 5.42 (dd, 2-H), 4.48 (ddd, 4-H), 4.35 (ddd, 4-H'), 4.30 (d),

5 4.25 (d), 3.76 (m, 2 H), 3.60 (m, 2 H), 3.39 (s, CH₃), 2.73 (m, 3-H), 2.35 (dddd, 3-H').

3.6 Herstellung von (RS)-2-(2-Phenoxyacetoxy)- γ -butyrolacton

Analog zu Beispiel 3.1 wurde 2-Brom- γ -butyrolacton mit 2-Phenoxyessigsäure und Triethylamin umgesetzt zu (RS)-2-(2-Phenoxyacetoxy)- γ -butyrolacton.

10 1 H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ = 7.29 (m, 2 H_{ar}), 7.00 (m, 1 H_{ar}), 6.91 (m, 2 H_{ar}), 5.52 (dd, 2-H), 4.76 (d), 4.72 (d), 4.41 (ddd, 4-H), 4.23 (ddd, 4-H'), 2.68 (m, 3-H), 2.30 (dddd, 3-H').

3.7 Herstellung von (RS)-2-(2-Chloracetoxy)- γ -butyrolacton

Analog zu Beispiel 3.1 wurde 2-Brom- γ -butyrolacton mit 2-Chloressigsäure und Triethylamin umgesetzt zu (RS)-2-(2-Chloracetoxy)- γ -butyrolacton.

1 H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ = 5.43 (dd, 2-H), 4.51 (ddd, 4-H), 4.35 (ddd, 4-H'), 4.21 (d), 4.18 m(d), 2.77 (m, 3-H), 2.38 (dddd, 3-H').

3.8 Herstellung von (RS)-2-(Octanoyloxy)- γ -butyrolacton

20 Eine Lösung von 297g 2-Brom- γ -butyrolacton und 285.6g n-Caprylsäure in 400ml Toluol wird auf 80°C erwärmt. Innert 2h werden bei 80°C Innentemperatur 219g Triethylamin zugetropft.

Die entstehende Suspension wird weitere 2 Stunden bei 80°C gerührt. Nach Abkühlen wird das Reaktionsgemisch nacheinander mit 300ml Wasser gewaschen, 300ml Toluol zugegeben, zweimal mit 200ml 5%ige Natriumbicarbonat-Lösung (mit 10% Kochsalz versetzt), mit 200ml

25 7.5%ige Natriumbicarbonat-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet.

Flüchtige Anteile werden im Vakuum entfernt. Der gelblich-braune Rückstand (345g) kristallisiert bei 4°C und besteht laut NMR aus reinem 2-(Octanoyloxy)- γ -butyrolacton (Gehalt lt. GC > 99%).

1 H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ = 5.42 (dd, 2-H), 4.48 (ddd, 4-H), 4.31 (ddd, 4-H'), 2.72 (m,

30 3-H), 2.41 (m, 2 H), 2.30 (dddd, 3-H'), 1.65 (m, 2 H), 1.30 (m, 8 H), 0.88 (t, 3 H).

Beispiel 4**Herstellung von (RS)-2-(Isobutyryloxy)- γ -butyrolacton**

Eine Lösung von 165 g 2-Brom- γ -butyrolacton (97% Gehalt) in 264 g Isobuttersäure wurde auf 80°C erwärmt. Innert 2 h wurden bei 80°C Innentemperatur 120 g Triethylamin zugetropft.

5 Die entstandene Suspension wurde weitere 4 h bei 80°C gerührt. Es wurde weiter wie in Beispiel 1 verfahren. Das verbleibende braune Öl (156 g) wurde im Vakuum destilliert (83°C / 0,08 mbar). Man erhielt 133 g (RS)-2-(Isobutyryloxy)- γ -butyrolacton als schwach gelbliche Flüssigkeit (Gehalt lt. GC > 98%).

10 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3): δ = 5.41 (dd, 2-H), 4.48 (ddd, 4-H), 4.32 (ddd, 4-H'), 2.7 (m, 3-H), 2.66 (sept, CHMe_2), 2.26 (dddd, 3-H'), 1.20 (dd, 6 H, CH_3).

Beispiel 5**Herstellung von (RS)-2-(2-Methoxyacetoxy)- γ -butyrolacton**

Eine Lösung von 165 g 2-Brom- γ -butyrolacton (97% Gehalt) in 270 g 2-Methoxyessigsäure 15 wurde auf 80°C erwärmt. Innert 2 h wurden bei 80°C Innentemperatur 120 g Triethylamin zugetropft. Die entstandene Suspension wurde weitere 8 h bei 80°C gerührt. Es wurde weiter wie in Beispiel 1 verfahren. Das verbleibende braune Öl (335 g) wurde im Vakuum destilliert (114°C / 0.2 mbar). Man erhielt 117 g (RS)-2-(2-Methoxyacetoxy)- γ -butyrolacton als schwach gelbliche Flüssigkeit (Gehalt lt. GC > 97%).

20 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3): γ = 5.53 (dd, 2-H), 4.50 (ddd, 4-H), 4.33 (ddd, 4-H'), 4.18 (d, -O- CH_2 -COO-), 4.12 (d, -O- CH_2 -COO-), 3.46 (s, 3 H, CH_3), 2.75 (dddd, 3-H), 2.35 (dddd, 3-H').

Beispiel 6**Herstellung von (RS)-2-(Benzoyloxy)- γ -butyrolacton**

Eine Lösung von 178 g 2-Brom- γ -butyrolacton (90% Gehalt) und 147 g Benzoësäure in 75 ml Toluol wurde auf 80°C erwärmt. Innert 2 h wurden bei 80°C Innentemperatur 120 g Triethylamin zugetropft. Die entstandene Suspension wurde eine weitere Stunde bei 80°C gerührt. Flüchtige Anteile wurden im Vakuum entfernt. Es wurde weiter wie in Beispiel 1 verfahren. Der verbleibende Feststoff (246 g) wurde mit 400 ml heißem Ethylacetat 30 umkristallisiert. Man erhielt als erste Kristallfraktion 167 g (RS)-2-Benzoyloxy- γ -butyrolacton als weiße Kristalle (Gehalt lt. GC > 99%).

¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ = 8.06 (m, 2 H_{ar}), 7.60 (m, H_{ar}), 7.46 (m, 2 H_{ar}), 5.64 (dd, 2-H), 4.53 (ddd, 4-H), 4.38 (ddd, 4-H'), 2.82 (m, 3-H), 2.42 (dd, 3-H').

Beispiel 7

5 **Herstellung von (R)-2-Hydroxy-γ-butyrolacton (R-HBL) und (S)-2-Acetoxy-γ-butyrolacton (S-ABL) aus racemischem 2-Acetoxy-γ-butyrolacton mit Lipasen**

7.1 mit lyophilisierten Lipasen

In 10 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) wurden 0,1 ml racemisches 2-Acetoxy-γ-
10 butyrolacton gelöst und 100 mg lyophilisierte Lipase gemäss Tabelle 1 hinzugegeben. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur gerührt. Für die Umsatz- und Enantiomerenreinheit-Bestimmung per GC wurden Proben genommen, ungelöste Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt, das Wasser im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in Butylacetat gelöst. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

15

Enzym	Reaktionszeit	ee (S-ABL)	Ee (R-HBL)
Lipase PS (Amano)	17 h	100%	94,2%
Lipase Ps. Fluorescens (Biocatalyst Ltd.)	17 h	100%	94,3%
Lipase Candida cylindracea (Biocatalyst Ltd.)	2 h	32,3%	80,4%
Lipase AH (Amano)	17 h	89,5%	93,1%

7.2 mit immobilisierter Lipase

In 10 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) wurden 0,1 ml racemisches 2-Acetoxy-γ-
butyrolacton gelöst und 25 mg immobilisierte Lipase aus Candida antarctica (Novozym 435
20 von Novo Nordisk) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Nach 2 h wurde für (R)-2-Hydroxy-γ-butyrolacton ein ee-Wert von 73,2% und für (S)-2-Acetoxy-γ-butyrolacton ein ee von 97,7% gefunden.

7.3 mit lyophilisierten Lipasen in organischen Lösungsmittel

a) In 10 ml n-Butanol wurden 0,1 ml racemisches 2-Acetoxy- γ -butyrolacton gelöst und 100 mg lyophilisierte Lipase hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

5

Enzym	Reaktionszeit	ee (S-MABL)	ee (R-HBL)
Lipase PS (Amano)	17 h	21%	89%
Lipase Ps. Fluorescens (Biocatalyst Ltd.)	17 h	33%	89%
Lipase AH (Amano)	17 h	14%	88%

b) In 10 ml n-Hexanol wurden 0,1 ml racemisches 2-Acetoxy- γ -butyrolacton gelöst und 100 mg lyophilisierte Lipase PS (Amano) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1

verfahren. Nach 72 h wurde für (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton ein ee von 84% und für (S)-2-Acetoxy- γ -butyrolacton ein ee von 69% gefunden.

Beispiel 8

Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (R-HBL) und (S)-2-(2-Methoxyacetoxy)- γ -butyrolacton (S-MABL) aus racemischem 2-(2-Methoxyacetoxy)- γ -butyrolacton mit

15 Lipasen

8.1 mit lyophilisierten Lipasen

In 10 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) wurden 0,1 ml racemisches 2-(2-Methoxyacetoxy)- γ -butyrolacton gelöst und 50 mg lyophilisierte Lipase hinzugegeben. Es

20 wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Enzym	Reaktionszeit	ee (S-MABL)	ee (R-HBL)
Lipase PS (Amano)	1 h	19,7%	79,1%
Lipase Ps. fluorescens (Biocatalyst Ltd.)	1 h	23,2%	81,6%
Lipase AH (Amano)	1 h	40,6%	83,6%

8.2 mit lyophilisierten Lipasen in organischen Lösungsmittel

In 10 ml n-Butanol wurden 0,1 ml racemisches 2-(2-Methoxyacetoxy)- γ -butyrolacton gelöst und 100 mg lyophilisierte Lipase hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren.

5 Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Enzym	Reaktionszeit	ee (S-ABL)	Ee (R-HBL)
Lipase PS (Amano)	21,5 h	52%	81%
Lipase Ps. Fluorescens (Biocatalyst Ltd.)	21,5 h	74%	79%
Lipase AH (Amano)	4 h	36%	85%

10 **Beispiel 9**

Herstellung von (*R*)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (R-HBL) und (*S*)-2-Propionyloxy- γ -butyrolacton (S-PrBL) aus racemischem 2-Propionyloxy- γ -butyrolacton mit lyophilisierten Lipasen in organischen Lösungsmittel

a) In 10 ml 2-Butanol wurden 0,1 ml racemisches 2-Propionyloxy- γ -butyrolacton gelöst und

15 100 mg lyophilisierte Lipase hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Enzym	Reaktionszeit	ee (S-PrBL)	ee (R-HBL)
Lipase PS (Amano)	22 h	75,3%	97,9%
Novozym 435 (Novo Nordisk)	1 h	89,2%	93,3%
Lipase AH (Amano)	6 h	62,7%	96,4%

b) In 10 ml Methyl-tert-butylether wurden 0,2 ml Alkohol und 0,1 ml racemisches 2-

20 Propionyloxy- γ -butyrolacton gelöst und 100 mg lyophilisierte Lipase hinzugegeben. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Enzym	Alkohol	Reaktionszeit	ee (S-PrBL)	ee (R-HBL)
Lipase PS (Amano)	Ethanol	3 h	22,8%	98,5%
	Isopropanol	3 h	17,6%	98,1%
	1-Butanol	3 h	29,7%	98,5%
	2-Butanol	3 h	18,3%	98,2%
Lipase AH (Amano)	Ethanol	1 h	55,4%	97,0%
	Isopropanol	1 h	35,7%	95,8%
	1-Butanol	1 h	74,9%	96,2%
	2-Butanol	1 h	34,2%	95,6%

Beispiel 10

Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (R-HBL) und (S)-2-Butyryloxy- γ -butyrolacton (S-BuBL) aus racemischem 2-Butyryloxy- γ -butyrolacton mit Lipasen

10.1 mit lyophilisierten Lipasen

In 10 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) wurden 0,1 ml racemisches 2-Butyryloxy- γ -butyrolacton gelöst und 50 mg lyophilisierte Lipase hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.1 zusammengefasst.

Enzym	Reaktionszeit	ee (S-BuBL)	ee (R-HBL)
Lipase PS (Amano)	1 h	99,4%	95,7%
Novozym 435 (Novo Nordisk)	1 h	99,1%	33,4%
Lipase aus <i>Ps. fluorescens</i> (Biocatalyst Ltd.)	1 h	99,4%	94,8%
Lipase aus <i>Candida cylindracea</i> (Biocatalyst Ltd.)	1 h	98,3%	39,4%
Lipase AH (Amano)	1 h	99,3%	73,3%

10.2 mit lyophilisierten Lipasen in organischen Lösungsmittel

a) In 10 ml 1-Butanol wurden 0,1 ml racemisches 2-Butyryloxy- γ -butyrolacton gelöst und 100 mg lyophilisierte Lipase hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren, wobei der Rückstand in Ethyl- oder Butylacetat aufgenommen wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle

5 8 zusammengefasst.

Enzym	Reaktionszeit	ee (S-BuBL)	ee (R-HBL)
Novozym 435 (Novo Nordisk)	0,5 h	41,6%	97,3%
Lipase aus <i>Ps. fluorescens</i> (Biocatalyst Ltd.)	22 h	45,0%	97,4%
Lipase AH (Amano)	4 h	89,6%	96,9%
Lipase AK (Amano)	6 h	86,6%	96,8%
Lipase PPL (Fluka)	6 h	61,9%	95,6%
Lipase AH-C I (Amano)	2 h	82,4%	88,1%
Lipase PS-C I (Amano)	6 h	84,0%	94,8%
Lipase PS-C II (Amano)	23 h	25,7%	96,4%

b) In 10 ml 2-Butanol wurden 0,5 g racemisches 2-Butyryloxy- γ -butyrolacton gelöst und 200 mg lyophilisierte Lipase aus *Ps. fluorescens* (Biocatalyst Ltd.) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Nach 28,5 h wurde (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton mit 98% ee und (S)-2-Butyryloxy- γ -butyrolacton mit 93,8% ee gefunden.

Bei der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches wurden ungelöste Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert und der ölige Rückstand mit 1 ml Wasser und 4 ml Toluol aufgenommen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit je 2 ml Toluol extrahiert. Die wässrige Phase wurde im Stickstoffstrom konzentriert. Es wurde (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton als farbloses Öl erhalten.
¹H-NMR (400 MHz; DMSO-d₆): δ = 5.90 (d, OH), 4.35 (ddd, 2-H), 4.27 (ddd, 4-H), 4.15 (ddd, 4-H'), 2.42 (dddd, 3-H), 2.00 (dddd, 3-H').

¹³C-NMR (100.6 MHz; DMSO-d₆): δ = 177.32 (C-1), 66.22 (C-2), 64.37 (C-4), 31.14 (C-3).

- c) In 11 2-Butanol wurden 50,0g racemisches 2-Butyryloxy- γ -butyrolacton (BuBL) gelöst und 10,0g lyophilisierte Lipase PS (Amano) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Nach 12h Reaktion bei Raumtemperatur (ca. 34% Umsatz; (R)-2-Hydroxy-BL mit 97.6% ee; S-BuBL mit 52.2% ee) wurde die Lipase durch Zentrifugation abgetrennt, die 5 alkoholische Lösung über ein 0.2 μ -Filter filtriert und das 2-Butanol im Vakuum abdestilliert (37°C, 13mbar). Der Rückstand wurde mit 400ml Toluol und 50ml Wasser aufgenommen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit 200ml Toluol extrahiert. Die wässrige Phase wurde im Vakuum aufkonzentriert (40°C, 20mbar). Es wurden 9.6g (R)-2-Hydroxy-BL als klare gelbliche Flüssigkeit erhalten mit >97% ee (GC).
- 10 α (589nm; 22°C; 1g/100ml in Chloroform) = 64.1°.

Beispiel 11

Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (R-HBL) und (S)-2-Isobutyryloxy- γ -butyrolacton (S-IbuBL) aus racemischem 2-Isobutyryloxy- γ -butyrolacton

- 15 **11.1 mit lyophilisierten Lipasen**
In 10 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) wurden 0,1 ml racemisches 2-Isobutyryloxy- γ -butyrolacton gelöst und 50 mg lyophilisierte Lipase PS (Amano) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Nach 1 h wurde für (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton 97,2% ee und für (S)-2-Isobutyryloxy- γ -butyrolacton 67,8% ee 20 gefunden.

11.2 mit lyophilisierten Lipasen in organischen Lösungsmittel

- a) In 10 ml 2-Butanol wurden 0,1 ml racemisches 2-Isobutyryloxy- γ -butyrolacton gelöst und 25 100 mg lyophilisierte Lipase hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren, wobei der Rückstand in Ethyl- oder Butylacetat aufgenommen wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Enzym	Reaktionszeit	ee (S-IbuBL)	ee (R-HBL)
Lipase PS (Amano)	70 h	96,3%	96,4%
Novozym 435 (Novo Nordisk)	6 h	81,8%	96,3%
Lipase AH (Amano)	46 h	35%	95,8%

- b) In 10 ml Methyl-tert-butylether wurden 0,2 ml Alkohol und 0,1 ml racemisches 2-Isobutyryloxy- γ -butyrolacton gelöst und 100 mg lyophilisierte Lipase hinzugegeben. Es wurde 5 weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Enzym	Alkohol	Reaktionszeit	ee (S-IbuBL)	ee (R-HBL)
Novozym 435 (Novo Nordisk)	Ethanol	3 h	98,1%	94,3%
	Isopropanol	1 h	98,0%	93,7%
	1-Butanol	3 h	92,6%	94,8%
	2-Butanol	1 h	96,7%	91,4%
Lipase AH (Amano)	Ethanol	6 h	23,5%	96,7%
	Isopropanol	6 h	31,2%	95,6%
	1-Butanol	6 h	30,7%	96,7%
	2-Butanol	6 h	28,7%	95,3%

10 **Beispiel 12**

Herstellung von (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton und (R)-2-Acetoxy- γ -butyrolacton aus racemischem 2-Acetoxy- γ -butyrolacton mit Protease

- In 10 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) wurden 0,1 ml racemisches 2-Acetoxy- γ -butyrolacton gelöst und 0,1 ml Savinase-Lösung (Protease aus *Bacillus* sp. von Novo Nordisk) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Nach 1 h wurde für (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton ein ee von 18,7% und für (R)-2-Acetoxy- γ -butyrolacton ein ee von 11,2% gefunden.

Beispiel 13**Herstellung von (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton und (R)-2-(2-Methoxyacetoxy)- γ -butyrolacton aus racemischem 2-(2-Methoxyacetoxy)- γ -butyrolacton mit Protease**

5

In 10 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) wurden 0,1 ml racemisches 2-(2-Methoxyacetoxy)- γ -butyrolacton gelöst und 0,1 ml Savinase-Lösung (Protease aus *Bacillus* sp. von Novo Nordisk) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Nach 22 h wurde für (R)-2-(2-Methoxyacetoxy)- γ -butyrolacton ein ee von 86,7% und für (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton ein ee von 7,1% gefunden.

10

Beispiel 14**Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (R-HBL) und (S)-2-Pentanoyloxy- γ -butyrolacton (S-PenBL) aus racemischem 2- Pentanoyloxy- γ -butyrolacton mit Lipasen**

15

14.1 mit lyophilisierten Lipasen

In 10 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) wurden 100 mg racemisches 2-Pentanoyloxy- γ -butyrolacton gelöst und lyophilisierte Lipase hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

20

Enzym	Reaktionszeit	ee (S-PenBL)	ee (R-HBL)
Lipase PS (Amano), 20 mg	0,5 h	98,7%	92,7%
Lipase AK (Amano), 20 mg	0,5 h	98,6%	87,4%
Lipase PPL (Fluka), 20 mg	0,5 h	98,6%	65,8%
Lipase Ps. fluorescens (Biocatalyst Ltd.), 20 mg	0,5 h	97,9%	89,1%

14.2 mit immobilisierten Lipasen

In 10 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) wurden 100 mg racemisches 2-Pentanoyloxy- γ -butyrolacton gelöst und immobilisierte Lipase hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

25

Enzym	Reaktionszeit	ee (S-PenBL)	ee (R-HBL)
Novozym 435 (Novo Nordisk), 2 mg	0,5 h	97,7%	81,7%
Lipase PS-C I (Amano), 10 mg	0,5 h	97,9%	70,8%
Lipase PS-C II (Amano), 10 mg	0,5 h	90,9%	93,8%

Beispiel 15

Herstellung von (*R*)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (*R*-HBL) und (*S*)-2-Hexanoyloxy- γ -butyrolacton (*S*-HexBL) aus racemischem 2- Hexanoyloxy- γ -butyrolacton mit Lipasen

15.1 mit lyophilisierten Lipasen

In 10 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7.0) wurden 100 mg racemisches 2-Hexanoyloxy- γ -butyrolacton gelöst und lyophilisierte Lipase hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Enzym	Reaktionszeit	ee (S-HexBL)	ee (R-HBL)
Lipase PS (Amano), 20 mg	1 h	98,1%	81,0%
Lipase AK (Amano), 20 mg	0,5 h	97,3%	61,7%
Lipase PPL (Fluka), 20 mg	1 h	99,9%	69,6%
Lipase Ps. fluorescens (Biocatalyst Ltd.), 20 mg	0,5 h	97,5%	78,6%

15.2 mit immobilisierten Lipasen

In 10 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7.0) wurden 100 mg racemisches 2-Hexanoyloxy- γ -butyrolacton gelöst und immobilisierte Lipase hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Enzym	Reaktionszeit	ee (S-HexBL)	ee (R-HBL)
Novozym 435 (Novo Nordisk), 2 mg	0,5 h	98,5%	83,1%
Lipase PS-C I (Amano), 10 mg	0,5 h	98,2%	53,9%
Lipase PS-C II (Amano), 10 mg	0,5 h	97,9%	89,3%

Beispiel 16**Herstellung von (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton und (R)-2-Pentanoyloxy- γ -butyrolacton aus racemischem 2-Pentanoyloxy- γ -butyrolacton mit Protease**

5

In 10 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) wurden 100 mg racemisches 2-Pentanoyloxy- γ -butyrolacton gelöst und 0,03 ml Savinase-Lösung (Protease aus Bacillus sp. von Novo Nordisk) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Nach 0,5 h wurde für (R)-2-Pentanoyloxy- γ -butyrolacton ee=31,3% und für (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton ee=19,1% gefunden.

10

Beispiel 17**Herstellung von (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton und (R)-2-Hexanoyloxy- γ -butyrolacton aus racemischem 2- Hexanoyloxy- γ -butyrolacton mit Protease**

15

In 10 ml eines 100mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) wurden 100 mg racemisches 2-Hexanoyloxy- γ -butyrolacton gelöst und 0,03 ml Savinase-Lösung (Protease aus Bacillus sp. von Novo Nordisk) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Nach 1 h wurde für (R)-2- Hexanoyloxy- γ -butyrolacton ee=57,9% und für (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton ee=21,7% gefunden.

20

Beispiel 18**Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton und (S)-2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton aus racemischem 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton mit Protease**

25

In 10 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) wurden 100 mg racemisches 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton gelöst und 0,03 mL Savinase-Lösung (Protease aus Bacillus sp. von Novo Nordisk) hinzugegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Nach 1 h wurde für (R)- 2-Hydroxy- γ -butyrolacton ee=29,0% bei 77,3% Umsatz gefunden und für (S)-2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton ee=98%.

30

Beispiel 19

Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (R-HBL) und (S)-2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton (S-OctBL) aus racemischem 2- Octanoyloxy- γ -butyrolacton mit Lipasen

5 **19.1 mit lyophilisierten Lipasen**

In 10 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) wurden 100 mg racemisches 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton gelöst und lyophilisierte Lipase hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Enzym	Reaktionszeit	ee (R-HBL)	Umsatz
Lipase PS (Amano), 20 mg	0,5 h	81,5%	53,8%
Lipase AK (Amano), 20 mg	0,5 h	61,0%	58,6%
Lipase PPL (Fluka), 20 mg	1 h	83,4%	53,7%
Lipase Ps. fluorescens (Biocatalyst Ltd.), 20 mg	0,5 h	80,6%	53,7%

10 **19.2 mit immobilisierten Lipasen**

In 10 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) wurden 100 mg racemisches 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton gelöst und immobilisierte Lipase hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Enzym	Reaktionszeit	ee (R-HBL)	Umsatz
Novozym 435 (Novo Nordisk), 2 mg	0,5 h	66,3%	59,6%
Lipase PS-C I (Amano), 10 mg	0,5 h	45,0%	68,8%
Lipase PS-C II (Amano), 10 mg	0,5 h	87,9%	53,0%

Beispiel 20**20.1 Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (R-HBL) und (S)-2-Pentanoyloxy- γ -butyrolacton (S-PenBL) aus racemischem 2- Pentanoyloxy- γ -butyrolacton mit****5 lyophilisierten Lipasen in organischen Lösungsmittel**

In 10 ml Alkohol wurden 500 mg racemisches 2-Pentanoyloxy- γ -butyrolacton gelöst und 200mg lyophilisierte Lipase PS (Amano) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

10

Alkohol	Reaktionszeit	ee (S-PenBL)	ee (R-HBL)
1-Butanol	37 h	61,9%	98,4%
2-Butanol	37 h	73,3%	98,2%

20.2 Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (R-HBL) und (S)-2-Hexanoyloxy- γ -butyrolacton (S-HexBL) aus racemischem 2- Hexanoyloxy- γ -butyrolacton mit**15 lyophilisierten Lipasen in organischen Lösungsmittel**

In 10 ml Alkohol wurden 500 mg racemisches 2-Hexanoyloxy- γ -butyrolacton gelöst und 200mg lyophilisierte Lipase PS (Amano) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

20

Alkohol	Reaktionszeit	ee (S-HexBL)	ee (R-HBL)
1-Butanol	37 h	83,4%	98,4%
2-Butanol	37 h	96,5%	97,9%

20.3 Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (R-HBL) und (S)-2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton (S-OctBL) aus racemischem 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton mit lyophilisierten Lipasen in organischen Lösungsmittel

In 10 ml Alkohol wurden 500 mg racemisches 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton gelöst und

- 5 200mg lyophilisierte Lipase PS (Amano) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Alkohol	Reaktionszeit	ee (R-HBL)	Umsatz
1-Butanol	30 h	98,7%	45%
2-Butanol	23 h	97,4%	39%

10 **Beispiel 21**

21.1 Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (R-HBL) und (S)-2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton (S-OctBL) aus racemischem 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton mit lyophilisierten Lipasen in organischem Lösungsmittel

a) Racemisches 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton wurde gemäss Tabelle 20 in 1-Butanol (mit

- 15 0,27% Wasser) oder 2-Butanol (mit 0,34% Wasser) gelöst und lyophilisierte Lipase PS (Amano) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse nach 7,25h sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

	rac-OctBL	Lipase PS	ee (R-HBL)	Umsatz
1-Butanol, 2,25ml	0,25g	100mg	99,2%	43%
1-Butanol, 2,0ml	0,5g	200mg	99,1%	47%
1-Butanol, 1,75ml	0,75g	300mg	99,0%	48%
2-Butanol, 2,25ml	0,25g	100mg	98,8%	50%
2-Butanol, 2,0ml	0,5g	200mg	99,1%	46%
2-Butanol, 1,75ml	0,75g	300mg	99,1%	44%

- 20 b) 30.0g racemisches 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton wurde in 70ml 1-Butanol gelöst und 6.0g lyophilisierte Lipase PS (Amano) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren.

Nach 4h 40min wurde die Reaktion gestoppt (42% Umsatz), der Biokatalysator über ein 0.2 μ -Filter abgetrennt, das Filtrat im Vakuum eingeengt (70°C, 20mbar), der Rückstand zwischen 23ml Wasser und 180ml Benzin verteilt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit 90ml Benzin extrahiert. Das Wasser wurde im Vakuum abdestilliert (40°C, 20mbar). Es wurden 5,36g R-HBL als klare gelblich-braune Flüssigkeit erhalten mit ee >99%. α (589nm; 22°C; 1g/100ml in Chloroform) = 66,3°

c) Racemisches 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton wurde gemäss Tabelle 21 in 1-Butanol (mit 0,01% Wasser), 2-Butanol (mit 0,11% Wasser), 1-Propanol (mit <0,05% Wasser) oder 2-Propanol (mit <= 0,005% Wasser) gelöst und lyophilisierte Lipase PS (Amano) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse nach 8h (wenn nicht anders angegeben) sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

	rac-OctBL	Lipase PS	ee (R-HBL)	Umsatz	Zeit
1-Butanol, 1,2ml	0,8g	160mg	98,8%	43%	
2-Butanol, 1,2ml	0,8g	160mg	98,0%	29%	
1-Propanol, 1,0ml	1,0g	250mg	99,0%	42%	
2-Propanol, 1,0ml	1,0g	250mg	97,8%	27%	
1-Butanol, 1,0ml	1,0g	250mg	98,6%	48%	
2-Butanol, 1,0ml	1,0g	250mg	97,8%	30%	
1-Propanol, 0,8ml	1,0g	300mg	98,8%	49%	
1-Propanol, 0,8ml	1,0g	100mg	99,0%	43%	26,5h
1-Propanol, 0,8ml	1,0g	50mg	99,1%	43%	45h
2-Propanol, 0,8ml	1,0g	300mg	97,8%	33%	
1-Butanol, 0,8ml	1,0g	300mg	98,4%	49%	
2-Butanol, 0,8ml	1,0g	300mg	97,4%	36%	
Ethanol, 0,6ml	1,0g	300mg	99,4%	41%	4h

d) Racemisches 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton wurde gemäss Tabelle 22 in Alkohol gelöst und lyophilisierte Lipase PS (Amano) hinzugegeben. Die Suspensionen wurden bei verschiedenen Temperaturen gerührt. Für die Bestimmung von Umsatz und Enantiomerenreinheit wurden

GC-Proben wie in Beispiel 7.1 beschrieben genommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

	rac-OctBL	Lipase PS	Temp.	ee (R-HBL)	Umsatz	Zeit
1-Butanol, 1,4ml	0,6g	60mg	24°C	98,7%	38%	24h
1-Butanol, 1,4ml	0,6g	60mg	40°C	98,0%	41%	24h
1-Butanol, 1,4ml	0,6g	60mg	60°C	95,7%	39%	24h
1-Propanol, 1,0ml	1,0g	250mg	24°C	98,9%	45%	8h
1-Propanol, 1,0ml	1,0g	250mg	40°C	98,4%	48%	8h
1-Propanol, 1,0ml	1,0g	250mg	60°C	96,8%	48%	8h

- 5 e) 600mg racemisches 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton wurde gemäss Tabelle 23 in 1,4ml 1-Butanol mit unterschiedlichen Wassergehalten gelöst und 60mg lyophilisierte Lipase PS (Amano) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Wassergehalt	ee (R-HBL)	Umsatz	Zeit
0,01%	98,8%	42%	24h
0,25%	98,7%	48%	24h
0,5%	99,2%	42%	8h
1%	99,1%	47%	8h
2%	98,8%	48%	8h
4%	97,8%	47%	6h
7%	93,8%	47%	2h
10%	94,7%	45%	2h

10

- f) 1,0g racemisches 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton wurde gemäss Tabelle 24 in 1,0 ml 1-Propanol mit unterschiedlichen Wassergehalten gelöst und 250mg lyophilisierte Lipase PS (Amano) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Wassergehalt	ee (R-HBL)	Umsatz	Zeit
0,02%	99,1%	45%	8h
0,25%	98,9%	49%	8h
0,5%	99,1%	46%	6h
1%	99,3%	47%	4h
2%	99,2%	47%	3h
4%	99,2%	46%	2h
7%	98,8%	50%	1h
10%	93%	54%	1h

5 g) 1,0g racemisches 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton wurde gemäss Tabelle 25 in 0,8ml 1-Propanol oder 0,6ml Ethanol mit unterschiedlichen Wassergehalten gelöst und lyophilisierte Lipase PS (Amano) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

	Wassergehalt	Lipase	ee (R-HBL)	Umsatz	Zeit
1-Propanol	0,5%	100mg	99,3%	36%	8h
1-Propanol	1%	100mg	99,3%	41%	8h
1-Propanol	2%	100mg	99,3%	43%	8h
1-Propanol	0,25%	50mg	99,3%	40%	24h
1-Propanol	0,5%	50mg	99,3%	42%	24h
1-Propanol	1%	50mg	99,3%	47%	24h
1-Propanol	2%	50mg	99,2%	49%	24h
Ethanol	0,25%	100mg	99,2%	45%	24h
Ethanol	0,5%	100mg	99,2%	48%	24h
Ethanol	1%	100mg	99,0%	49%	24h
Ethanol	2%	100mg	98,9%	50%	24h

21.2 Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (R-HBL), (S)-2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton (S-OctBL) und (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (S-HBL) aus racemischem 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton mit lyophilisierten Lipasen in organischem Lösungsmittel

5

a) 278g racemisches 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton wurden in 223ml 1-Propanol (Wassergehalt 2%) gelöst und 19,5g lyophilisierte Lipase PS (Amano) hinzugegeben. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Nach 21h wurde die Reaktion gestoppt (47% Umsatz), der Biokatalysator abfiltriert, mindestens einmal mit 20 ml 1-Propanol gewaschen

10 und das Filtrat im Vakuum eingeengt (60°C, 20mbar), der Rückstand zwischen 223ml Wasser und 1670ml Benzin verteilt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit 835ml Benzin extrahiert. Das Wasser wurde im Vakuum abdestilliert (40°C, 20mbar). Es wurden 53,1g R-HBL als dunkelbraunes Öl erhalten mit 99,4% ee.

15 Zur weiteren Reinigung wurde das Rohprodukt mit 200ml Ethylacetat aufgenommen, mit 6g Aktivkohle versetzt und 1h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration wurde das Ethylacetat im Vakuum entfernt (40°C, 20mbar). Es wurden 51,4g R-HBL als klare, bräunlich-orange Flüssigkeit erhalten mit praktisch unveränderter Enantiomerenreinheit.

20 b) Aus dem Rest der ersten Benzin-Phase wurden bei 4°C 113,8g 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton als hellbraune, glänzende Schuppen kristallisiert (Reinheit > 97% laut GC). Die Hydrolyse mit Novozym-435-Immobilisat in 1-Propanol ergab S-HBL mit 92,9% ee. Umkristallisation aus Benzin ergab 104,7g 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton (Reinheit > 99,5% laut GC). Die Hydrolyse mit Novozym-435-Immobilisat in 1-Propanol ergab S-HBL mit 98,6% ee.

25

c) Ein Aliquot des abfiltrierten Enzyms (2%) wurde repetitiv unter gleichen Bedingungen in Biotransformationen eingesetzt mit 5,6g racemischem 2-Octanoyloxy- γ -butyrolacton in 4,4ml 1-Propanol (Wassergehalt 2%). Die Reaktionsgemische wurden bei 30°C geschüttelt oder gerührt. Durch die Probennahme zur analytischen Verfolgung der Reaktion nahm die Menge 30 des Enzyms in jeder wiederholten Biotransformation um 1-4% ab. Die Ergebnisse sind in

Tabelle 26 dargestellt, wobei als Biotransformation 1 die Daten der oben beschriebenen Umsetzung von 278g Substrat mit aufgenommen sind.

Biotransformation	Reaktionszeit	ee (R-HBL)	Umsatz
1	21:20h	99,2%	47%
2	19:00h	99,3%	49%
3	20:15h	99,1%	47%
4	21:50h	99,0%	44%
5	21:00h	99,1%	46%
6	24:00h	98,6%	37%
7	22:00h	99,0%	46%
8	23:00h	99,0%	47%
9*	22:45h	99,0%	48%
10	24:10h	99,0%	40%
11	22:00h	98,8%	46%
12	22:00h	97,8%	45%
13	22:15h	98,5%	42%
14	17:20h	97,8%	46%
15	22:00h	99,0%	34%
16	22:00h	99,2%	34%

5 *Für die Reaktion #9 wurde 1-Propanol mit 1% Wassergehalt verwendet.

Beispiel 22**Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (R-HBL) und (S)-2-(2-(2-Methoxyethoxy)-acetoxy)- γ -butyrolacton aus racemischem 2-(2-(2-Methoxyethoxy)-acetoxy)- γ -butyrolacton mit lyophilisierter Lipase in organischem Lösungsmittel**

5 0,75g racemisches 2-(2-(2-Methoxyethoxy)-acetoxy)- γ -butyrolacton wurde in 15ml 2-Butanol (0,12% Wassergehalt) gelöst und mit 375mg lyophilisierter Lipase PS (Amano) versetzt. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Nach 4h wurde R-HBL mit 96,1% ee gefunden (44% Umsatz).

10

Beispiel 23**Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (R-HBL) und (S)-2-(2-Phenylacetoxy)- γ -butyrolacton aus racemischem 2-(2-Phenylacetoxy)- γ -butyrolacton mit lyophilisierter Lipase in organischem Lösungsmittel**

15 0,75g racemisches 2-(2-Phenylacetoxy)- γ -butyrolacton wurde in 15ml 2-Butanol (0,12% Wassergehalt) gelöst und mit 375mg lyophilisierter Lipase PS (Amano) versetzt. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Nach 125h wurde R-HBL mit 90,5% ee gefunden (30% Umsatz).

20

Beispiel 24**Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (R-HBL) und (S)-2-(2-Phenoxyacetoxy)- γ -butyrolacton aus racemischem 2-(2-Phenoxyacetoxy)- γ -butyrolacton mit lyophilisierter Lipase in organischem Lösungsmittel**

25 0,75g racemisches 2-(2-Phenoxyacetoxy)- γ -butyrolacton wurde in 15ml 2-Butanol (0,12% Wassergehalt) gelöst und mit 375mg lyophilisierter Lipase PS (Amano) versetzt. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Nach 2h wurde R-HBL mit 86,7% ee gefunden (38% Umsatz).

Beispiel 25

Herstellung von (R)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (R-HBL) und (S)-2-(2-Chloracetoxy)- γ -butyrolacton aus racemischem 2-(2-Chloracetoxy)- γ -butyrolacton mit lyophilisierter

5 Lipase in organischem Lösungsmittel

0,75g racemisches 2-(2-Chloracetoxy)- γ -butyrolacton wurde in 15ml 2-Butanol (0,12% Wassergehalt) gelöst und mit 375mg lyophilisierter Lipase PS (Amano) versetzt. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Nach 4h wurde R-HBL mit 91,5% ee und (S)-2-(2-Chloracetoxy)- γ -butyrolacton mit 44,9% ee gefunden (32% Umsatz). Nach 20h wurde (S)-2-(2-Chloracetoxy)- γ -butyrolacton mit 89,8% ee gefunden (52% Umsatz).

Beispiel 26

Herstellung von (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolacton (S-HBL) und (R)-2-(2-Phenylacetoxy)- γ -butyrolacton aus racemischem 2-(2-Phenylacetoxy)- γ -butyrolacton mit immobilisierter

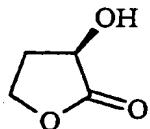
15 Penicillin-Amidase in organischem Lösungsmittel

0,1g racemisches 2-(2-Phenylacetoxy)- γ -butyrolacton wurde in 2ml 2-Butanol (0,12% Wassergehalt) gelöst und mit 100mg immobilisierter Penicillin-Amidase (Fluka) versetzt. Es wurde weiter wie in Beispiel 7.1 verfahren. Nach 95h wurde S-HBL mit 34,5% ee gefunden.

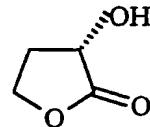
Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von (R)- und/oder (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolactonen der Formeln I und II

5

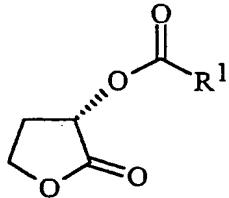


I

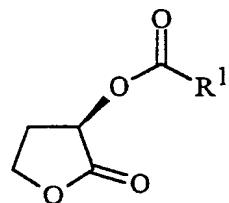


II

10



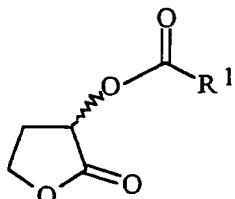
III



IV

15

worin R¹ gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Cycloalkyl, (Cycloalky)alkyl, Cycloheteroalkyl, (Cycloheteroalky)alkyl, Alkoxyalkyl, Aryl, Heteroaryl, Arylalkyl, Heteroarylalkyl oder Aryloxyalkyl bedeutet, worin ein racemisches 2-Acyloxy- γ -butyrolacton der allgemeinen Formel V

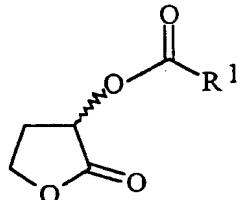


V

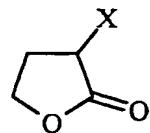
worin R¹ die genannte Bedeutung hat, mittels einer Hydrolase zu den Verbindungen der Formeln I oder II umgesetzt wird, wobei die Verbindungen der Formeln III oder IV anfallen.

- 5 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Hydrolase eine Lipase oder Protease verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydrolyse bei einer Temperatur von 0 bis 100°C und bei einem pH von 3 bis 12 durchgeführt wird.
- 10 4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Lipase eine Lipase aus einem Bakterium der Gattung Pseudomonas ist oder eine aus einer solchen Lipase erzeugte Variante.
- 15 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Lipase eine Lipase aus Pseudomonas cepacia oder Pseudomonas fluorescens ist.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das racemische 2-Acyloxy- γ -butyrolacton der allgemeinen Formel V

20



- 25 2-Halogen- γ -butyrolacton der allgemeinen Formel VI



VI

worin X ein Halogenatom bedeutet, mit einer Carbonsäure der allgemeinen Formel VII

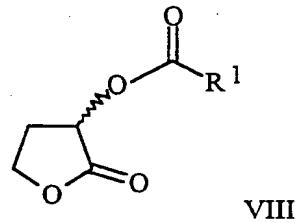
5



VII

umgesetzt wird.

10 7. 2-Acyloxy- γ -butyrolacton gemäss der allgemeinen Formel VIII



VIII

worin R¹ die in Anspruch 1 genannte Bedeutung hat und vorzugsweise gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Alkoxyalkyl, Arylalkyl oder Aryloxyalkyl bedeutet.

15

8. 2-Acyloxy- γ -butyrolacton gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das 2-Acyloxy- γ -butyrolacton ausgewählt ist aus der Gruppe enthaltend 2-(Isobutyryloxy)- γ -butyrolacton, 2-(2-Methoxyacetoxy)- γ -butyrolacton, 2-Chloracetoxy- γ -butyrolacton, 2-Phenoxyacetoxy- γ -butyrolacton und 2-Phenylacetoxy- γ -butyrolacton.

20

9. 2-Acyloxy- γ -butyrolacton gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass R¹ ein linearer C₅₋₁₈-Alkylrest ist.

10. 2-Acyloxy- γ -butyrolacton gemäss einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das 2-Acyloxy- γ -butyrolacton ein (R)- oder (S)- oder (RS)- 2-Acyloxy- γ -butyrolacton ist.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. März 2001 (15.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/18231 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07D 307/33

[DE/CH]; Sandstrasse 7, CH-3930 Visp (CH). KALBERMATTEN, Georges [CH/CH]; Staffa, CH-3938 Aussenberg (CH).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08810

(74) Anwälte: RITTALER, Wolfgang usw.; Winter Brandl Furniss Hübner Röss Kaiser Polte Partnerschaft, Alois-Steinecker-Str. 22, 85354 Freising (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. September 2000 (08.09.2000)

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

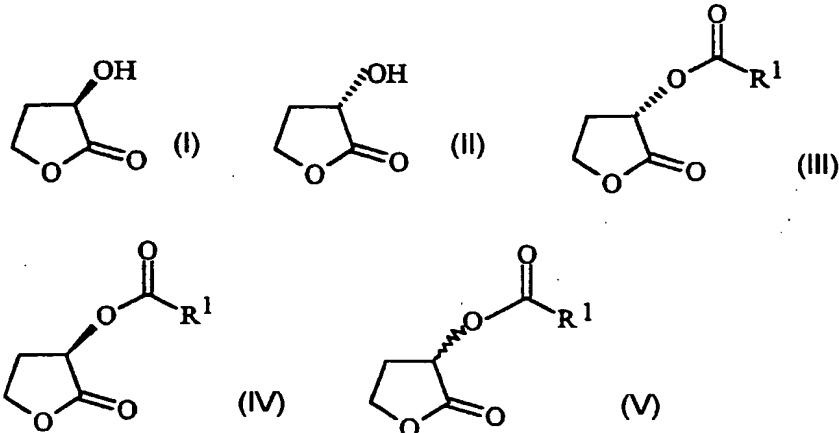
(30) Angaben zur Priorität:
99117685.0 8. September 1999 (08.09.1999) EP
60/185,366 28. Februar 2000 (28.02.2000) US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): LONZA AG [CH/CH]; Münchensteinerstrasse 38, CH-4052 Basel (CH).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING (R) OR (S)-HYDROXY- γ -BUTYROLACTONE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON (R)- ODER (S)-HYDROXY- γ -BUTYROLACTON



WO 01/18231 A3

(57) Abstract: The invention relates to a novel method for producing (R) and/or (S)-2-hydroxy- γ -butyrolactones of formulas (I) and (II) and/or for producing (S) and/or (R)-2-acyloxy- γ -butyrolactones of the general formulas (III) and (IV). According to said method, a racemic 2-acyloxy- γ -butyrolactone of general formula (V) is converted into the compounds of formulas (I) or (II) using hydrolases, whereby the compounds of formulas (III) or (IV) are obtained as a by-product.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein neues Verfahren zur Herstellung von (R)- und/oder (S)-2-Hydroxy- γ -butyrolactonen der Formeln (I) und (II) und/oder von (S)- und/oder (R)-2-Acyloxy- γ -butyrolactonen der allgemeinen Formeln (III) und (IV), worin ein racemisches 2-Acyloxy- γ -butyrolacton der allgemeinen Formel (V) mittels Hydrolasen in die Verbindungen der Formeln (I) oder (II) umgesetzt wird, wobei die Verbindungen der Formeln (III) oder (IV) anfallen.



(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts: 13. September 2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No
PCT/EP 00/08810

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07D307/33

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	E. FRANCOTTE ET AL.: "Analytic and preparative resolution of .gamma.-and .delta.-lactones by chromatography on cellulose triacetate. Relationship between elution order and absolute configuration" HELVETICA CHIMICA ACTA., vol. 70, 1987, pages 1569-1582, XP002163690 VERLAG HELVETICA CHIMICA ACTA. BASEL., CH ISSN: 0018-019X page 1570; examples 16B-16D; table 1 abstract ---	7,10
A	EP 0 467 132 A (CHISSO CORP) 22 January 1992 (1992-01-22) page 4 -page 5; claims; examples ---	1-6
X	EP 0 467 132 A (CHISSO CORP) 22 January 1992 (1992-01-22) page 4 -page 5; claims; examples ---	7,10
A	---	1
	---	-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 March 2001

Date of mailing of the international search report

20/04/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Paisdor, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/EP 00/08810

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 439 779 A (CHISSO CORP) 7 August 1991 (1991-08-07) page 7 -page 8; claims; examples ----	7,10
A	R.N. BEN ET AL.: "Synthesis of Optically Active alpha-Amino Esters via Dynamic Kinetic Resolution: A Mechanistic Study" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 64, 1999, pages 7700-7706, XP002163691 EASTON US the whole document ----	1
E	GB 2 347 674 A (CHISSO CORP) 13 September 2000 (2000-09-13) abstract; claims page 10 -page 13; examples 1-9 ----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/08810

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0467132 A	22-01-1992	JP 2939646 B		25-08-1999
		JP 4077456 A		11-03-1992
		DE 69124298 D		06-03-1997
		DE 69124298 T		05-06-1997
		SG 50443 A		20-07-1998
		US 5324852 A		28-06-1994
EP 0439779 A	07-08-1991	JP 2542941 B		09-10-1996
		JP 3228694 A		09-10-1991
		DE 69021711 D		21-09-1995
		DE 69021711 T		22-02-1996
		US 5084392 A		28-01-1992
GB 2347674 A	13-09-2000	JP 2000253897 A		19-09-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen
PCT/EP 00/08810

A. KLASSEFIZIERTUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C07D307/33		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C07D		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BEILSTEIN Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ⁺	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	E. FRANCOTTE ET AL.: "Analytic and preparative resolution of gamma.- and delta.-lactones by chromatography on cellulose triacetate. Relationship between elution order and absolute configuration" HELVETICA CHIMICA ACTA., Bd. 70, 1987, Seiten 1569-1582, XP002163690 VERLAG HELVETICA CHIMICA ACTA. BASEL., CH ISSN: 0018-019X Seite 1570; Beispiele 16B-16D; Tabelle 1 Zusammenfassung ---	7,10
A	EP 0 467 132 A (CHISSO CORP) 22. Januar 1992 (1992-01-22) Seite 4 -Seite 5; Ansprüche; Beispiele ---	1-6
X	EP 0 467 132 A (CHISSO CORP) 22. Januar 1992 (1992-01-22) Seite 4 -Seite 5; Ansprüche; Beispiele ---	7,10
A	EP 0 467 132 A (CHISSO CORP) 22. Januar 1992 (1992-01-22) Seite 4 -Seite 5; Ansprüche; Beispiele ---	1
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsatum veröffentlicht worden ist		*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 27. März 2001		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 20/04/2001
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Paisdor, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern:	als Aktenzeichen
PCT/EP 00/08810	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 439 779 A (CHISSO CORP) 7. August 1991 (1991-08-07)	7,10
A	Seite 7 -Seite 8; Ansprüche; Beispiele ---	1
A	R.N. BEN ET AL.: "Synthesis of Optically Active alpha-Amino Esters via Dynamic Kinetic Resolution: A Mechanistic Study" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, Bd. 64, 1999, Seiten 7700-7706, XP002163691 EASTON US das ganze Dokument ---	1
E	GB 2 347 674 A (CHISSO CORP) 13. September 2000 (2000-09-13) Zusammenfassung; Ansprüche Seite 10 -Seite 13; Beispiele 1-9 -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Int. Aktenzeichen
PCT/EP 00/08810

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0467132 A	22-01-1992	JP	2939646 B	25-08-1999
		JP	4077456 A	11-03-1992
		DE	69124298 D	06-03-1997
		DE	69124298 T	05-06-1997
		SG	50443 A	20-07-1998
		US	5324852 A	28-06-1994
EP 0439779 A	07-08-1991	JP	2542941 B	09-10-1996
		JP	3228694 A	09-10-1991
		DE	69021711 D	21-09-1995
		DE	69021711 T	22-02-1996
		US	5084392 A	28-01-1992
GB 2347674 A	13-09-2000	JP	2000253897 A	19-09-2000